

4種の野菜中のホスホリパーゼの特性について

Characterization of phospholipases from four kind of edible vegetables

仁 科 淳 良
Atsuyoshi Nishina

1. はじめに

平成18年度は、天候が良好であったため、野菜類が豊作となり、全体的に野菜の値段が下落した。キャベツ、白菜などが出荷前に畑で廃棄（産地廃棄）され、社会的に批判を浴びた。農林水産省では、「野菜の産地廃棄に代わるアイデアの公募」等を行って、対策を協議したが、有効な解決法は見つかっていない。本研究では、廃棄野菜を含む、野菜の新しい利用法の探索を目的として、野菜が含有する酵素に着目した。

野菜中の酵素の利用に関してはいくつかの先行技術がある。オリーブオイルの搾油にオリーブ果実の酵素を併用することにより、オリーブオイルの品質が向上する⁽¹⁾。また、31種の果物、33種の野菜および2種のキノコ中の酵素により消臭効果を測定した報告がある⁽²⁾。発酵したキュウリの物性を制御するために、キュウリの熱処理条件を検討した報告がある⁽³⁾。ラット肝臓の酸化的DNA損傷がメキャベツ抽出物中の酵素により阻害された⁽⁴⁾。メチルヒドラジンを注射して発ガン処理したラットに乾燥キャベツ40%入り飼料を与え、体内酸化また変換酵素へ調節の影響を報告している⁽⁵⁾。キュウリ中の脂肪酸ヒドロペルオキシド切断酵素、脂質分解酵素の機能に関して調査した研究もある⁽⁶⁻¹³⁾。なす中のコリンエステラーゼ、リポキシゲナーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ及びカタラーゼの特性を調べた研究もある⁽¹⁴⁾。

本研究では、群馬県産の4種の野菜（キャベツ、なす、キュウリ、大根）のリン脂質加水分解酵素に着目した。野菜から粗酵素粉末を調製し、リン脂質加水分解酵素の実用性に関する検討を行った。

2 実験材料と方法

2.1 酵素反応基質組成

精製大豆レシチン（ツルーレシチン社製、SLP-P I パウダー）、塩化カルシウム水溶液（試薬特級 無水0.18g/5mL）、デオキシコール酸ナトリウム（生化学用試薬0.34g/50mL）、精製水、0.02N水酸化カリウム水溶液を用いた。

精製大豆レシチン3gに精製水200mLを加え、室温で1時間攪拌した。この溶液に別途調製した塩化カルシウム水溶液（試薬特級 無水0.18g/5mL）とデオキシコール酸ナトリウム（生化学用試薬0.34g/50mL）を加え、室温で30分後攪拌した。その後、水冷下で15分間、8000rpmでホモジナイズし酵素反応基質溶液とした。

2.2 比較対照に用いた市販酵素

リポモッド699L（ジェネンコ協和製）、Lysomax（ジェネンコ協和製）、Foodpro PLA₂（ダニスコ製）、PLA₂（ナガセ製）、リソナーゼ（サンヨーファイン製）を用いた。

2.3 アセトンパウダー調製法

粗酵素試料の調製はDavidsonとLongの方法に従い行なった⁽⁴⁵⁾。すなわち、試料のキャベツ葉400gに純水600mlを加え、氷冷下にてワーリングブレンダー（ハイパワーホモジナイザー、広沢鉄工所社製）でホモジナイズ（10,000rpm, 1 min, 5回）した。これをガーゼろ過し、ろ液を遠心分離機（CX-250, Tomy社製）で遠心分離（10,000rpm, 4℃, 30min）した。得られた上澄液を遠心分離（10,000rpm, 4℃, 30min）した。得られた上澄液（熱処理画分）に2倍量の冷アセトンを攪拌しながら加え、氷冷下で1時間静置した後、生じた沈殿を遠心分離（10,000rpm, 4℃, 30min）して回収し、真空凍結乾燥機（VD-800F, Taitec社製）で凍結乾燥した。凍結乾燥物を氷冷させた乳鉢で微粉末にし、得られたアセトンパウダーを粗酵素試料とし、更なる精製を行なうまで、-20℃で保存した。

2.4 PLD活性測定法

PLD活性の測定は、ImamuraとHoriutiのコリンオキシダーゼ法に従い行なった⁽⁴⁶⁾。基質乳化液は卵黄レシチン（PC-98N, PC含量99.1%, Q.P. Fine Chemicals社製）0.1gに40mMデオキシコール酸ナトリウム（SDC）10mlを加え、氷冷下で超音波ホモジナイザー（US150, 日本精機製作所社製）を用いて、完全にレシチンを分散させ、1%（w/v）PC乳化液を調製した。試験管に0.2M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）0.1ml、0.1M塩化カルシウム0.1mlおよび蒸留水0.6mlをとり、よく混和した後、酵素液0.1mlを加え、37℃で5分間予備加温した後、基質として1%（w/v）PC乳化液0.1mlを加え、全量を1.0ml（終濃度：20mM酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）、10mM塩化カルシウム、4mM SDC、0.1%（w/v）PC）として、37℃で10分間酵素反応を行なった。0.1Mエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA）含む1Mトリス・塩酸緩衝液（pH 8.0）0.2mlを加え、酵素反応を停止させた。次に、①コリンオキシダーゼ（COX, *Alcaligenes* sp.由来, 500U, Sigma社製）の全量約48mgを400mMトリス・塩酸緩衝液（pH 8.0）20mlに溶解したCOX溶液（25U/ml）、②パーオキシダーゼ（POX, 西洋わさび由来, 100U/mg, Wako社製）4mgを20mlの純水に溶解したPOX溶液（20U/ml）、③20mM 4-アミノアンチピリン溶液、および④32mMフェノール溶液の①～④を使用直前に等量混合したコリン発色液0.2mlを加えて、37℃で1時間酵素反応させた。その後、1%（w/v）Triton X-100 2mlを加えた後、吸収波長500nmの吸光度を測定した。なお、塩化コリンの水溶液を標準液として酵素液の代わりに用いて同様に操作し、検量線を作成した。酵素力価は37℃で1分間に1 μ molのコリンを遊離する酵素活性を1Uとした。

2.5 PLA2活性測定法

pHスタット装置一式（メトローム社製）、ソニケーター（ブランソン社製）を用いた。力価1万単位/mLの標準液1mLに精製水9mLを加えて溶かし、酵素標準溶液とした。2.1の基質溶液20mLを攪拌子とともに平底試験管（2.5cm ϕ * 12cm）に入れ、事前に10分間以上40℃の恒温槽に浸けた。攪拌子をまわしながらpHスタットにより滴定液の単位時間あたりの消費量を測定した。滴定液は0.02N水酸化カリウム水溶液とした。レコーダーにモニターした滴定液の消費量を平均して一分間あたりの消費量（b mL）として求めた。一分間に消費されたKOHの μ モル数を読み取り力価とした。標準溶液の消費量も測定し、下式で標準溶液に対する相対力価を算出した。

読み取り力価 = $0.02 * b * a * 1,000,000 / \text{注入量} (\mu\text{L})$

力価 = $(\text{試料溶液の読みとり力価} / \text{標準溶液の読みとり力価}) \times \text{標準品の表示力価}$

2.6 タンパク質の定量

タンパク質の定量はPierce社のBCA Protein Assay Reagent kitを用い以下のように行った。まずBSAを10mg精秤し、ミリQ水を加え、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のBSA溶液を調整した。1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のBSA溶液とミリQ水を混ぜ、100、200、400、600、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の各濃度のBSA標準液を調製した。1.5mlチューブに0、100、200、400、600、800、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のBSA溶液を20 μl ずつ入れ、BCA発色液（BCA-A液：BCA-B液=50：1）200 μl を加えた。同様に前項で調整したタンパクサンプルをミリQ水で10倍希釈した溶液20 μl を1.5mlチューブに入れBCA発色液200 μl を加えた。37℃で30分間インキュベート後、攪拌し、96穴プレートに200 μl ずつ移した。562nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。BSA標準液の測定値から検量線を求め、サンプルのタンパク濃度を算出した。タンパク量として20 μg 分のサンプルをSDS-PAGEに供した。

2.7 SDS-PAGE

電気泳動装置はエクセルシュアロック ミニセル、ゲルは12%ビストリスグリシンゲル、緩衝液としてNuPAGE SDS ランニングバッファー（いずれもインビトロジェン社）を用いた。4種野菜の粗酵素をタンパク質換算で125 μg ロードした。操作法はインビトロジェン社の推奨する方法に従った。泳動は200V定電圧で50分間行った。

2.8 タンパク質の可視化

染色液としてシンプリーブルー セーフステイン（インビトロジェン社製）を用いた。操作は製品に付属するプロトコールに従った。すなわち、電気泳動後のゲルを脱イオン水で5分間×3回洗浄後、20mlのシンプリーブルー セーフステイン中で1時間染色した。染色後脱イオン水で1時間洗浄した。

2.9 薄層クロマトグラフィー

展開槽（カマグ製）、展開溶媒（クロロホルム/メタノール/0.05%塩化カルシウム=120/70/16、v/v/v、クロロホルム/メタノール/28%アンモニア水=120/70/16、v/v/v）、薄層プレート（シリカゲルF₂₅₄；メルク製）、発色試薬（ニンヒドリン試薬、ディットマー試薬、リン酸硫酸銅試薬）、ホットプレート、ドライヤーを用いた。展開槽に展開溶媒を6ml（3ml/駒込ピペット）を入れ、展開槽内を展開溶媒で充分飽和させた。薄層プレートの下から1cmのところに、鉛筆でスポットする目印を付け、サンプル（10mg/ml）の各2 μL をマイクロシリンジで薄層プレートにスポットした。ドライヤーで薄層プレートを活性化した後、展開槽内にいれ、展開した。薄層プレートをドライヤーで乾燥した後、発色試薬を均一に噴霧し70～100℃で加熱した（ホットプレート）。

3. 結 果

3.1 酵素活性の測定

ホスホリパーゼA（PLA）活性の測定

市販の力価がわかっている酵素の1、2、5、5単位を基質溶液に添加したときの、滴定液の消費量を図1に示した。図1から検量線（図2）を作成した。次に4種の野菜の粗酵素100mgを基質溶液に添加したときの、滴定液の消費量を図3に示した。図3の傾きから、各粗酵素の力価を算出した（表1）。各粗酵素のタンパク質含量を表2に示した。以上の結果から算出した比活性（タンパク質100mgあたりのユニット数）を併せて表2に示した。

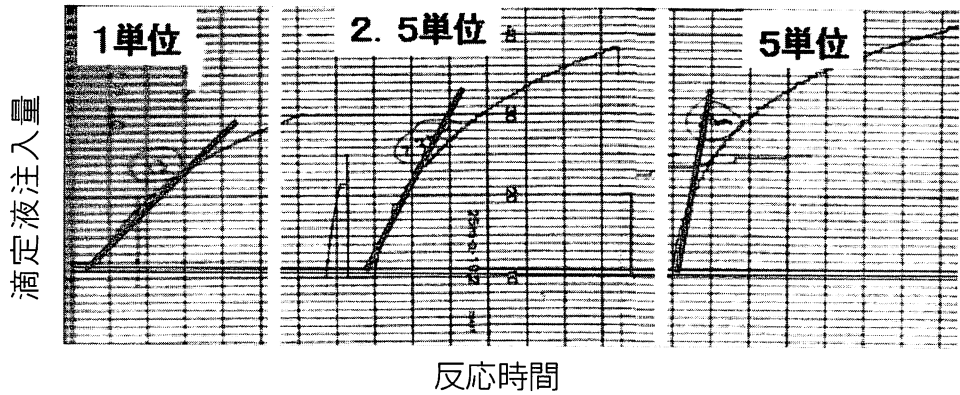


図1 酵素添加量とアルカリ注入量の関係

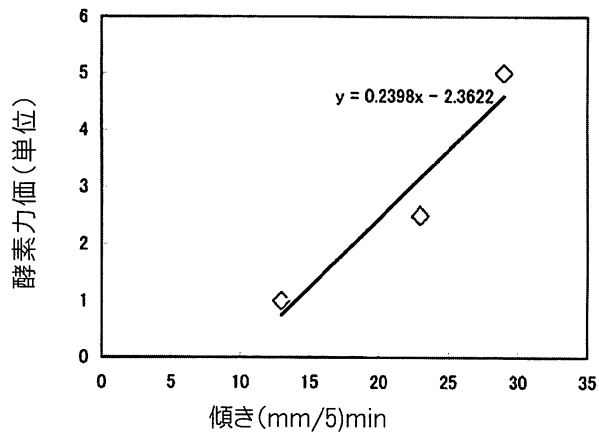


図2 酵素力価検量線

ホスホリパーゼD (PLD) 活性の測定

各粗酵素のPLD活性を表1に、比活性を表2に示した。表2から、キャベツ、大根、キュウリの粗酵素はPLD、PLA活性の両方を有しており、ナスの粗酵素はPLD活性が弱いことがわかった。

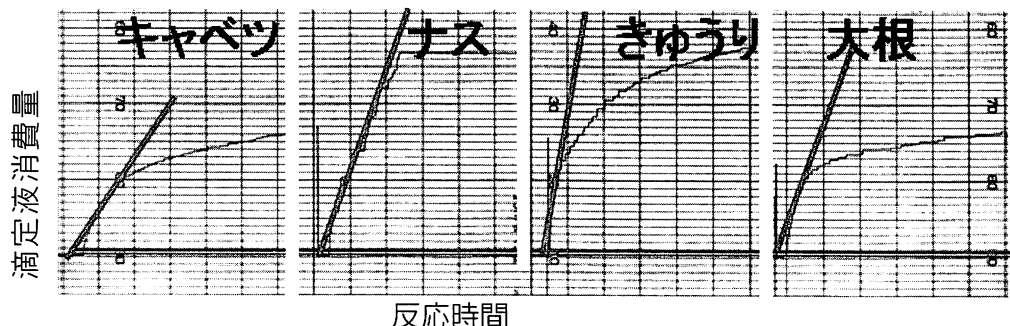


図3 4種野菜粗酵素のアルカリ消費量

表1 4種の野菜粗酵素の力価

	キャベツ	ナス	キュウリ	大根
PLA活性	2.08	4.12	5.56	3.28
PLD活性	3.53	0.09	1.35	2.62

単位:UNIT/100mg

表2 4種野菜粗酵素の蛋白含量と比活性

蛋白含量(mg/g)	キャベツ	ナス	キュウリ	大根
蛋白含量(mg/g)	775	949	406	250
比活性 (単位/蛋白100mg)	2.75	5.46	7.36	4.34
	4.68	0.12	1.79	3.47

3.2 蛋白組成

野菜粗酵素と市販の酵素の蛋白組成を比較するためにSDS-PAGEを行った結果を図4に示した。既往の研究から、PLDの分子量はキャベツ73、87、イネ78、82、ニチニチソウ50、125、ミカン91、94、PLAの分子量はイネ12、13、ジャガイモ40、ソラマメ14、70（いずれも単位はKDa）と報告されている⁽¹⁷⁻²⁶⁾。大根、キュウリ、キャベツの粗酵素では、50および80KDa前後に明確なバンドが認められた。ナスの粗酵素は60および80KDa前後にバンドが認められた。

一方、PLAとして市販されている酵素のSDS-PAGEの結果を併せて図4に示した。次項で述べるように、市販酵素のPLAとしての作用は互いに類似していたが、蛋白組成は大きく異なっていた。50 kDa付近にバンドが認められたのは1種（リソナーゼ）のみで、20 kDa未満の低分子が主要成分であることがわかった。商品のシェルフライフを長くするために、あらかじめプロテアーゼ等で処理して、活性を有する低分子成分のみを用いて製品化しているものと推定した。特に、最もPLAとしての活性が強かったリポモッド699Lは成分の大部分が低分子成分であった。

市販のPLD（旭化成製）には46 kDaに明確なバンドが認められ、高分子側、低分子側にタンパク質のバンドは認められなかった（データ省略）

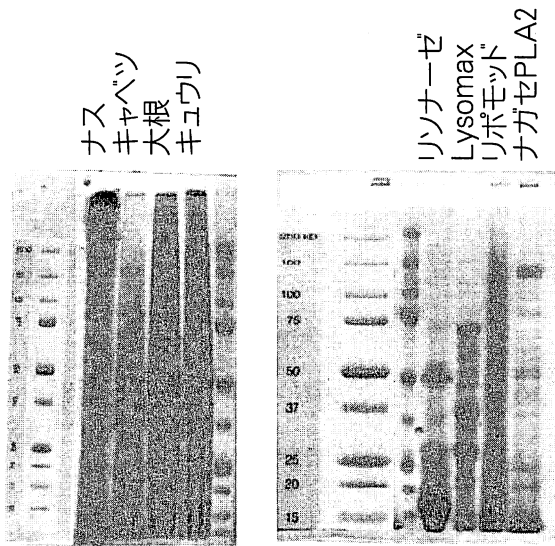


図4 各種野菜と市販酵素の蛋白組成比較

3.3 市販酵素の活性比較

基質溶液に市販の酵素を用いて反応した結果を図5に示した。基質溶液に主要成分の一つであるホスファチジルエタノールアミン (PE) の減少と、PEの加水分解物であるリゾホスファチジルエタノールアミン (LPE) の増加をTLCで観察した。リポモッド699Lを100単位投入して2時間反応することにより、基質溶液中のPEが消失しLPEが生成することがわかった。以後の比較対照としてリポモッド699Lを用いることとした。

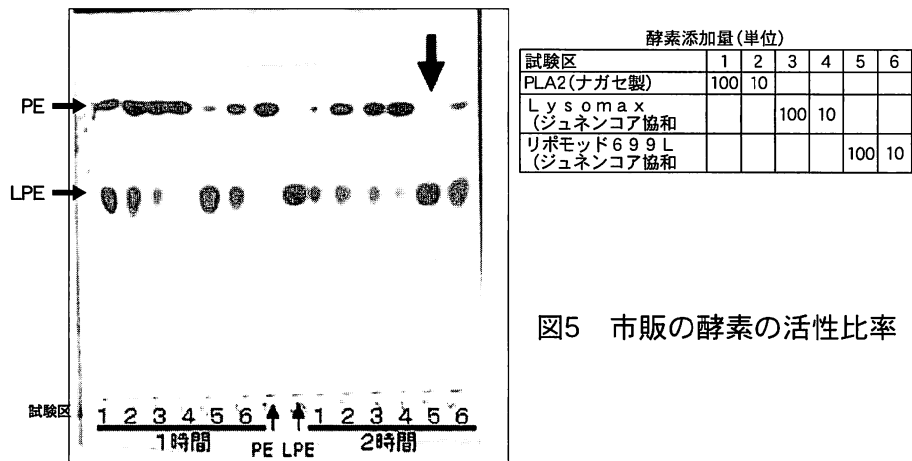


図5 市販の酵素の活性比率

3.4 野菜酵素の特性把握

4種の酵素の特性(基質特異性、反応生成物)を比較するために、基質溶液中で酵素反応を行い、基質の減少と、反応生成物の増加を薄層クロマトグラフィーで分析した。結果を図6から8に示した。基質の減少と増加する反応物の種類を表3にまとめた。表3から、以下の特性が明らかになった。

仁科：4種の野菜中のホスホリパーゼの特性について

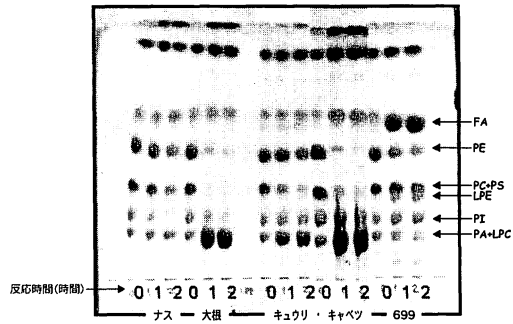


図6 各種酵素のリン脂質混合物に対する作用
全有機物

PE:ホスファチジルエタノールアミン, PC:ホスファチジルコリン, PI:ホスファチジイルノール,
PS:ホスファチジルセリン, PA:ホスファチジン酸, LPE:リノホスファチジルエタノールアミン, FA:脂肪酸

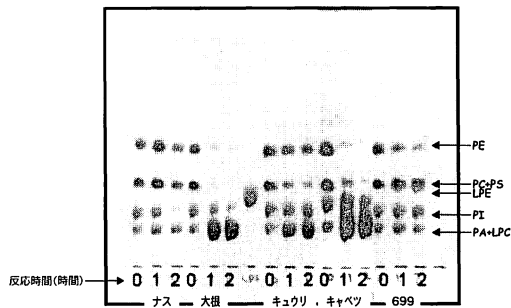


図7 各種酵素のリン脂質混合物に対する作用
リン脂質

PE:ホスファチジルエタノールアミン, PC:ホスファチジルコリン, PI:ホスファチジイルノール,
PA:ホスファチジン酸, LPE:リノホスファチジルエタノールアミン

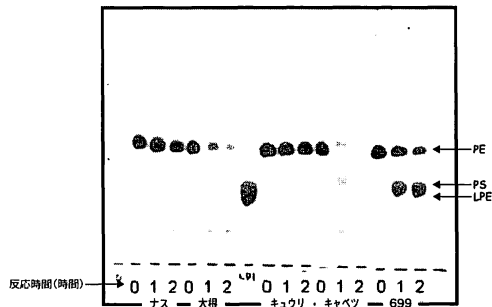


図8 各種酵素のリン脂質混合物に対する作用
アミノ基

PE:ホスファチジルエタノールアミン, PS:ホスファチジルセリン, LPE:リノホスファチジルエタノールアミン

表 3 各種野菜酵素の基質特異性と反応物

	基質特異性			反応物
ナス	PE ↓	PC ↓	PI ↓	FA ↑
大根	PE ↓	PC ↓	PI ↓	PA ↑
キュウリ	PE →	PC ↓	PI →	PA ↑
キャベツ	PE ↓	PC ↓	PI →	PA ↑ FA ↑
699	PE ↓	PC →	PI →	FA ↑ LPE ↑

PE:ホスファチジルエタノールアミン、PC:ホスファチジルコリン、PI:ホスファチジルイノシトール、
PA:ホスファチジン酸、LPE:リノホスファチジルエタノールアミン、FA:脂肪酸、

ナスの粗酵素は基質溶液中のPE,ホスファチジルコリン (PC) , ホスファチジルエタノールアミン (PI) を分解し、脂肪酸 (FA) が生成することがわかった。PE,PC, ホスファチジルイノシトール (PI) のリゾ体が認められなかったことから、PE,PC,PIのもつ2本の脂肪酸の両方を加水分解する作用を示すことがわかった。PAが生成しなかった。ナスには、ホスホリパーゼB (PLB) またはPLA1とPLA2の両方が含まれており、PLDとしての作用は微弱であると推定した。

大根の粗酵素は、基質溶液中のPE,PC,PIを分解し、PAが生成することがわかった。大根中には、PE,PC,PIのすべてに作用するPLDが含まれていることがわかった。

キュウリの粗酵素は、PCのみを分解し、PAが生成することがわかった。キャベツ中には、PCのみに作用するPLDが含まれていることがわかった。

キャベツ粗酵素は、PEとPCを分解し、PAとFAを生成した。ホスファチジルコリン (LPC、LPEは生成しなかった。キャベツにはPEおよび/またはPCに作用するPLBとPLDが含まれていることがわかった。

比較対照として用いたリポモッド699Lは、PEを分解してFAとLPEを生成することがわかった。すなわちリポモッド699LにはPEに特異的に作用するPLAが含まれていた。

4. まとめ

廃棄野菜の有効な利用法の一つの可能性を探索するために、群馬県産の野菜中に含まれるリン脂質加水分解酵素の特性に関する検討を行った。今回供試した4種の野菜すべてにリン脂質を加水分解する活性が認められた。しかし、それぞれの野菜の粗酵素の基質特異性や反応物は大きく異なっていた。野菜の酵素を工業的に利用するためには、精製を行い、機能を絞り込む必要があると考えられた。市販の酵素と蛋白組成を比較した結果、市販の酵素の主成分が20 kDa未満の低分子タンパク質であることがわかった。野菜の酵素を精製する際に、予備的に酵素の分解を行い、目標とする活性を有する低分子画分を分画する方法を考える必要があると推定した。

工業的に使用されているリン脂質加水分解酵素は微生物または動物の臓器由来であり、安全性が疑問視されている。食品工業で、酵素を使用したときには、反応後に熱処理等で失活する必要があるが、動物の臓器由来のPLA₂は熱安定性が高く、最終製品に活性のある酵素がキャリアオーバーしている可能性も指摘されている。今回我々が着目した酵素は食用の野

菜由来であり、食品添加物でなく食品として利用できるのも、安全性が高く、失活の必要がなく、食の安全が求められている時代のニーズにあっていると思われる。

今後、本研究で用いた粗酵素を精製し、特性を絞り込むとともにコスト計算を行い、実用化の可能性を明らかにしたいと考えている。

5. 参考文献

1. Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., and Del Re, P. (2003) *Eur Food Res Technol* 216(2), .109-115
2. Negishi, O. (1999) *Food Sci Technol Res* 5(2), .176-180
3. Meurer, P., and Gierschner, K. (1992) *Acta Aliment* 21(2), .171-188
4. Sorensen, M., and Loft, S. (2001) *Food Chem Toxicol* 39(6), .533-540
5. Khanum, F., Anilakumar, K. R., Viswanathan, K. R., and Sudarshana Krishna, K. R. (1998) *Nutr Res* 18(10), .1733-1741
6. GALLIARD, T., and PHILLIPS, D. R. (1976) *Biochim Biophys Acta* 431, No.2, .278-287
7. GALLIARD, T., and PHILLIPS, D. R. (1976) *Biochim Biophys Acta* 424, No.1, .26-35
8. GALLIARD, T., PHILLIPS, D. R., and REYNOLDS, J. (1976) *Biochim Biophys Acta* 441, No.2, .181-192
9. Yamauchi, N., Yamawaki, K., Ueda, Y., and Chachin, K. (1984) 園芸学会雑誌 53(3), .347-353
10. Lee, D. H., and Lee, C. B. (2000) *Plant Sci* 159(1), .75-85
11. PHILLIPS, D. R., and GALLIARD, T. (1976) *Phytochemistry* 15, No.11, .1647-1650
12. PHILLIPS, D. R., and GALLIARD, T. (1978) *Phytochemistry* 17, No.3, .355-358
13. 山本淳子, and 大羽和子. (2000) 名古屋女子大学紀要 家政・自然編
14. Lopez-Nicolas, J. M., Perez-Gilabert, M., and Garcia-Carmona, F. (2001) *J Agric Food Chem* 49(1), .433-438
15. Davidson, F. M., and Long, C. (1958) *Biochem. J.* 69, 458-466
16. Imamura, S., and Horiuti, Y. (1978) *J. Biochem.* 83, 677-680
17. Senda, K., Yoshioka, H., Doke, N., and Kawakita, K. (1996) *Plant Cell Physiol* 37(3), .347-353
18. Kim, D. K., Lee, H. J., and Lee, Y. (1994) *FEBS Lett* 343(3), .213-218
19. Sato, H., Watanabe, T., Sagane, Y., Nakazawa, Y., and Takano, K. (2000) *Food Sci Technol Res* 6(1), .29-33
20. Ueki, J., Morioka, S., Komari, T., and Kumashiro, T. (1995) *Plant Cell Physiol* 36(5), .903-914
21. Wissing, J. B., Grabo, P., and Kornak, B. (1996) *Plant Sci* 117(1/2), .17-31
22. Becher, A., Wissing, J. B., Wylegalla, C., and Wagner, K. G. (1994) *Plant Sci* 97, No.2, .143-151
23. Wang, X., Dyer, J. H., and Zheng, L. (1993) *Arch Biochem Biophys* 306(2), .486-494
24. Abousalham, A., Riviere, M., Teissere, M., and Verger, R. (1993) *Biochim Biophys Acta* 1158(1), .1-7
25. Witt, W. (1987) *Arch Biochem Biophys* 259(1), .164-170
26. Heller, M., Mozes, N., and Peri. (1974) *Biochim Biophys Acta* 369, No.3, .397-410

要旨

一般市販の野菜のうち、キャベツ、なす、きゅうり、大根から、粗酵素粉末を調製した。4種の粗酵素粉末の、リン脂質加水分解酵素（市中で高価に販売されている）としての実用性を探索した。4種の野菜に含まれるリン脂質加水分解酵素（PL）の特性を測定した結果、4種の野菜に含まれるPLは特性が異なることがわかった。ナスの粗酵素には、PLBまたはPLA₁とPLA₂の両方が含まれており、PLDとしての作用は微弱であることが示唆された。大根の粗酵素には、PE,PC,PIのすべてに作用するPLDが含まれていることがわかった。キュウリの粗酵素には、PCのみに作用するPLDが含まれていることがわかった。キャベツ粗酵素にはPEおよび/またはPCに作用するPLBとPLDが含まれていることがわかった。今回供試した野菜酵素の特性が大きく異なるという結果は、本研究で始めて明らかになった。野菜酵素の実用性を明らかにするためには分画した後に再度、特性を測定する必要があると考えた。

SUMMARY

Property of phospholipase in crude enzyme powders that prepared from cabbage, eggplant, cucumber and radish were investigated. It was confirmed that the substrate specificity and species in reaction products were dependant on sources of enzymes. Both PLB or PLA₁ and PLA₂ were included and the amount of PLD was slight in crude enzyme powder of eggplant. PLD that acts on all of PE, PC, and PI is included in crude enzyme powders of radish. PLD that acts only on PC is included in crude enzyme powders of cucumber. PLB and PLD that act on PE PC are included in cabbage crude enzyme powders. The deference of the various vegetable enzymes' properties was confirmed for the first time. To clarify the property of vegetable enzymes in detail, reinvestigation after purification of them will be necessary.

Keywords: vegetable, phospholipase, substrate specificity, reaction products